

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	兒島 正人
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目 Single-cell DNA and RNA sequencing of circulating tumor cells (循環腫瘍細胞の 1 細胞解析)			
論文審査担当者			
主査	教授	岡田 賢	印
審査委員	教授	大上 直秀	
審査委員	准教授	谷本 圭司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>血中循環腫瘍細胞 (CTC) は全身の腫瘍組織由来であり、1 細胞単位で別々に解析を行うことで、より正確かつ詳細に腫瘍不均一性を評価できることが期待される。</p> <p>1 細胞単位で遺伝子解析を行うには、全ゲノム増幅 (WGA)、全トランスクリプトーム増幅 (WTA) を行う必要がある。WGA は PCR 反応によるもの、multiple displacement amplification (MDA) 反応によるもの、PCR 反応と MDA 反応を組み合わせたものに大きく分類される。WTA においては、逆転写、cDNA 合成、増幅といった過程において異なる手法が存在している。そのため、これらの違いが解析過程で予期しないバイアスをもたらすことが懸念されている。本研究では神経芽腫細胞株 TGW を用いて、CTC を 1 細胞単位で解析する実際の工程に即した形で、様々な WGA、WTA 法を用いて比較検討を行った。</p> <p>TGW 細胞を健常人から採取した血液に混入し、抗 GD2 抗体を用いた蛍光活性化セルソーティング (FACS) で分取を行った。4 種類の WGA 法、3 種類の WTA 法を使用し、次世代シーケンサーで解析を行った。WGA 法は PCR 反応によるもの、MDA 反応によるものを 2 種類、PCR 反応と MDA 反応を組み合わせたものを使用した。PCR 反応によるものは DNA 断片化と共通配列を有するアダプター付加により同一のプライマーで増幅が行われる。MDA 反応による WGA 法の内、一方は DNA プライマーゼである Tth Prim Pol がゲノムにランダムに結合し、短いプライマーを生成し、もう一方はランダムなプライマーセットを用いて、DNA 鎖置換活性を有する phi29 polymerase によって増幅 (MDA) が行われる。PCR 反応と MDA 反応を組み合わせたものでは、共通配列とランダムな配列両方を有するプライマーセットがゲノムにランダムに結合し、Bst polymerase による MDA が行われる。末端にプライマーの共通配列と相補的な配列をもつアンプリコンが生成されるとループを形成し、特</p>			

定のサイクル数の PCR 反応にて増幅が行われる。これら WGA 産物を用いた 8 つのがん関連遺伝子 (*BRAF*, *EGFR*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*) の増幅と、次世代シーケンスで網羅的遺伝子解析での Depth of coverage と Uniformity of coverage を比較した。

3 種類の WTA 法では、逆転写に poly T プライマーを使用する点は共通であるが、cDNA の増幅過程において 2 種類の PCR 反応によるもの、1 種類の MDA 反応によるものを使用した。2 種類の PCR 反応は、まず逆転写酵素が鋳型 RNA の 5' 末端に達すると、逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性により、cDNA の 3' 末端に特定の短いシトシンリッチな配列が自動的に付加される。この短い付加配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを加え、合成された cDNA の 3' 末端にハイブリダイズさせ、共通配列を有する鋳型を提供する。これにより cDNA の 3' 末端に共通配列に相補的な配列が付加されることとなり、これらの配列に基づき設計されたプライマーセットによる PCR 反応で増幅が行われる。違いは、一方において locked nucleic acid (LNA) テクノロジーを用いて、付加するオリゴヌクレオチドにグアニンを変性させた人工核酸を用いることで、ハイブリダイズ効率が増し、高い特異性で cDNA 合成、増幅が可能となっている。MDA 反応による WTA 法では poly T プライマーを用いて逆転写を行った後、phi29 DNA polymerase により cDNA 増幅が行われる。増幅産物を用いた網羅的遺伝子発現解析で得られたリード数、検出した発現遺伝子数、遺伝子発現パターンを比較した。

結果は、MDA 反応による WGA 法が高い増幅効率を有し、高い Depth of coverage を示した。Uniformity of coverage はサンプルごとに大きく異なり、ランダムなプライマーセットと phi29 DNA polymerase を用いた MDA 反応による WGA 法のサンプルにおいてのみ高い値 (>80%) を示した。一方、WTA 法においては、MDA 反応による WTA 法は PCR 反応による WTA 法と比べてトランスクリプトから得られたリード数は少なく、非特異的で偏った遺伝子発現パターンを示していた。これらは phi29 polymerase による増幅バイアスの影響であると推察された。また、LNA テクノロジーを組み合わせた PCR 反応による WTA 法の方が検出感度、精度ともに優れていた。

結論として、WGA 法ではランダムなプライマーセットと phi29 DNA polymerase による MDA 反応が、WTA 法では LNA テクノロジーを組み合わせた PCR 反応が CTC の 1 細胞単位での遺伝子解析に適していることが分かった。

以上の結果から、本論文は神経芽腫細胞株の細胞を用いた循環腫瘍細胞 (CTC) の 1 細胞解析モデルを用いて、1 細胞からの全ゲノム増幅 (WGA) には ランダムなプライマーセットと phi29 DNA polymerase による MDA 反応が、全トランスクリプトーム増幅 (WTA) には LNA テクノロジーを組み合わせた PCR 反応が有用であることを示した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。